

UNIVERSIDAD DE CUENCA



**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

“Detección del virus rábico en glándula parótida de ratones CD-1 inoculados con diferentes dosis de virus estándar de desafío (CVS)”.

Tesis de Grado, previa a la obtención del
Título de Médico Veterinario Zootecnista

AUTORES: Juan Diego Quezada Alvarado. C.I. 0106422181

DIRECTOR: Dr. Jaime Maldonado Rivera M.V.Z. Mg. Sc. C.I: 0103631248

CUENCA – ECUADOR



Resumen

El presente trabajo titulado: “Detección del virus rábico en glándula parótida de ratones CD-1 inoculados con diferentes dosis de Virus Estándar de Desafío”. Se realizó en el laboratorio del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública- Leopoldo Izquieta Pérez - Regional Austro.

El presente trabajo tiene como finalidad valorar el uso de tejido parotídeo para la detección del virus rábico mediante inmunofluorescencia directa en ratones CD-1 tras la inoculación experimental en cerebro con varias dosis de virus estándar de desafío. Para el diagnóstico del virus rábico se usó la técnica estándar de inoculación intracebral con Virus Estándar de Desafío. Se formaron cuatro grupos de 20 ratones con distintas dosis de antígeno; la detección del virus en improntas de tejido cerebral y parotídeo se realizó mediante inmunofluorescencia directa. Para determinar la asociación de los factores en estudio (tejido, tiempo y dosis de virus estándar), se realizaron los siguientes cálculos: Chi-cuadrado, prueba exacta de Fisher y regresión logística binaria. El tipo de tejido, las dosis de antígeno y el tiempo de detección del virus rábico, no mostraron diferencia significativa alguna. Lo que permitió concluir que es posible usar tejido parotídeo para la detección de virus rábico en ratones CD-1.

Palabras clave: *virus rábico, impronta en cerebro, impronta en tejido parotídeo.*



Abstract

The present work is entitled "Detection of rabies virus in the parotid gland of CD-1 mice inoculated with different doses of Standard Challenge Virus". It was carried out in the laboratory of the National Institute of Public Health Research - Leopoldo Izquieta Pérez - Austro Regional. The present work aims to evaluate the use of parotid tissue for the detection of rabies virus using direct immunofluorescence in CD-1 mice after experimental inoculation in the brain with several doses of standard challenge virus. The standard technique of intracerebral inoculation with Standard Virus of Challenge was used for the diagnosis of rabies virus. Four groups of 20 mice were formed with different doses of antigen; detection of virus in imprints of the brain and parotid tissue was performed by direct immunofluorescence. To determine the association of factors under study (tissue, time and dose of standard virus), the following calculations were performed: Chi-square, Fisher exact test and binary logistic regression. The type of tissue, the antigen doses and the time of detection of the rabies virus did not show any significant difference. This led to the conclusion that it is possible to use parotid tissue for the detection of rabies virus in CD-1 mice.

Keywords: *rabies virus, imprint in brain, imprint in parotid tissue*



CONTENIDO

1. INTRODUCCION.....	10
OBJETIVOS	11
Objetivo general:	11
Objetivos específicos:	11
HIPÓTESIS.....	11
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	12
2.1. Virus rábico.	12
2.2. Sinonimia.....	12
2.3. Distribución:	12
2.4. Agente etiológico.....	13
2.5. Taxonomía:	13
2.6. Morfología:	14
2.7. Transmisión	14
2.8. Epidemiología:	15
2.9. Patogenia de la rabia.....	15
2.9.1. Patogénesis del Sistema Nervioso Central	16
2.10. Diseminación del Virus rábico desde el SNC a otros órganos.....	16
2.11. Manifestaciones clínicas.....	17



2.12. Periodo de incubación.....	18
2.13. Diagnóstico.....	18
2.13.1. Método biológico:	19
2.13.2. Método no biológico:	20
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
3.1. Materiales:.....	22
3.1.1. Materiales de laboratorio:.....	22
3.1.2. Materiales de escritorio:	23
3.2. Métodos:.....	24
3.2.1. Metodología para la investigación experimental:	24
3.2.1.1. <i>Factor de estudio:</i>	24
3.2.2. Métodos de laboratorio.....	24
3.2.3. Obtención, procesamiento, y análisis de las improntas de tejido cerebral y tejido parotídeo en el laboratorio:	24
3.2.3.2. <i>Extracción de la muestra de tejido parotídeo.</i>	25
3.2.5.5. <i>Observar las improntas de tejido parotídeo en el microscopio de epifluorescencia</i>	26
3.2.6. Método estadístico:	27
4. RESULTADOS.....	29
5. DISCUSIÓN.....	33
6. CONCLUSIONES.....	34
7. RECOMENDACIONES.....	35
BIBLIOGRAFÍA	36



8. ANEXOS.....	39
----------------	----

Índice de ilustraciones

Figura 1. Ciclo de transmisión de la Rabia Canina.....	14
Figura 2. ciclo epidemiológico de la Rabia.....	15
Figura 3. Inoculación Intracerebral en ratones CD-1.....	19
Figura 4. Esquema de lámina de IFD para rabia.....	20
Figura 5. Simbología empleada en la técnica de IFD.....	20
Figura 6. Fundamento... ..	21
Figura 7. Unión del conjugado antirrábico al antígeno rábico.....	21

Índice de tablas.

Tabla N 1. Variantes virales del virus rábico.....	13
Tabla N°2. Presencia de virus rábico tras inoculación intracerebral de virus estándar de desafío.....	29
Tabla N°3. Presencia de virus rábico tras inoculación intracerebral de virus estándar de desafío en base a los diferentes grupos de dosificación	30



Cláusula de Propiedad Intelectual

Yo Juan Diego Quezada Alvarado autor del trabajo de titulación *"Detección del virus rábico en glándula parótida de ratones CD-1 Inoculados con diferentes dosis de virus estándar de desafío (CVS)"*, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca 27 de octubre de 2017

Juan Diego Quezada Alvarado

C.I: 0106422181



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio
Institucional

Yo Juan Diego Quezada Alvarado calidad de autor titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "*Detección del virus rábico en glándula parótida de ratones CD-1 inoculados con diferentes dosis de virus estándar de desafío (CVS)*", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cenca 24 de octubre de 2017

Juan Diego Quezada Alvarado

C.I: 0106422181



DEDICATORIA

“No intentes convertirte en un hombre de éxito, intenta convertirte en un hombre de valor”.

-Albert Einstein

A mis padres Sara y José por el apoyo brindado en el transcurso de mi vida para alcanzar mis metas.

A mi novia Karol por todos sus consejos, palabras de aliento y apoyo para la realización de este proyecto.

A mis amigas y amigos con los cuales se compartió momentos inolvidables que perduraran en la memoria por siempre.

Juan Diego Quezada



AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a Dios quien me ha bendecido en este largo camino, permitiéndome llegar a mi meta, haciendo realidad este sueño anhelado, por brindarme la vida y el don de la perseverancia y fortaleza para avanzar cada día y ser mejor.

A mis padres José Quezada y Sara Alvarado por ser mi motor y mi guía en cada camino por el que he decidido ir, gracias por su ejemplo dedicación y palabras de aliento nunca bajaron los brazos para que yo tampoco lo haga, aun cuando todo se complicaba. Por ser el pilar fundamental en todo lo que soy. Los Amo.

También dejo en constancia mi más profundo agradecimiento la universidad Estatal de Cuenca, a la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, a todos sus docentes y colaboradores por la oportunidad que me han brindado para alcanzar mi formación profesional.

A mi director de tesis Dr. Jaime Maldonado Rivera; a cada uno de los miembros del tribunal Dr. Carlos Vaca, Dra. María Encalada y al Dr. Antonio Vallecillo, por todo ese apoyo fundamental en esta investigación que me propuse.

Un especial agradecimiento al Instituto Nacional de investigación en salud pública (INSPI) coordinación zonal 6 quienes me permitieron la apertura de sus instalaciones para realizar esta investigación; al Dr. Emilio Ochoa responsable del Centro de Referencia de Zoonosis; y al Dr. Gabriel Guzmán responsable del Bioterio, quienes me brindaron el apoyo teórico científico, su experiencia, su paciencia para que esta investigación culmine con éxito.

A mi novia Karol Maldonado, por su apoyo y estímulo que posibilitaron la conquista de esta meta.

A mis amigas y amigos por confiar y creer en mí y haber hecho de esta etapa un trayecto de vivencias que nunca olvidare. Los verdaderos amigos siempre se conocen los caminos difíciles de atravesar gracias por estar siempre ahí.

Juan Diego Quezada



1. INTRODUCCION

De acuerdo a la Organización mundial de la salud (OMS) la rabia es una enfermedad zoonotica viral que ataca al sistema nervioso central (SNC) generalmente aguda, cuyo agente causal es un virus. Todos los animales de sangre caliente, incluyendo al hombre son susceptibles en mayor o menor grado, pudiendo ser transmitida por mordedura o el arañazo profundo de un animal infectado.

El virus de la rabia pertenece a la clase V (virus *ARN mono catenario negativo*), familia *Rhabdoviridae*, género *Lyssavirus*, especie *Rabbies virus*. Teniendo como característica la forma de una bala. Es una enfermedad de distribución mundial, de elevada prevalencia en África y Asia. En América Latina la presencia de rabia silvestre, ocasiona graves pérdidas en el sector ganadero. Se han presentado brotes en ganado bovino en zonas donde se ha identificado la presencia de murciélagos hematófagos, que son el reservorio natural del virus.

La toma de muestras para el diagnóstico presenta cierta dificultad para el Médico Veterinario, ya que el examen se ha limitado al uso de tejido cerebral donde el virus de la rabia es particularmente abundante. Pero presenta cierta dificultad de acceso y mayor riesgo de contaminación.

Esta investigación permitió el uso de tejido parotídeo en el diagnóstico de virus rábico. Contribuyendo con el estudio de una variante que implica evitar la posibilidad de una infección en las personas que abren las cabezas de los animales.



Para el presente trabajo investigativo se han planteado los siguientes objetivos:

OBJETIVOS

Objetivo general:

1. Valorar el uso de tejido parotídeo para la detección del virus rábico mediante inmunofluorescencia directa en ratones CD-1 tras la inoculación experimental en cerebro con varias dosis de virus estándar de desafío.

Objetivos específicos:

1. Determinar los intervalos de tiempo de detección de virus rábico en tejido parotídeo de ratones CD-1 inoculados con diferentes dosis de CVS (virus estándar de desafío).
2. Identificar la dosis de CVS (virus estándar de desafío) que permite el diagnóstico de rabia en tejido parotídeo, mediante el uso de inmunofluorescencia directa para determinar su especificidad y sensibilidad analítica.
3. Elaborar un protocolo analítico para el uso de tejido parotídeo en el diagnóstico de rabia.

HIPÓTESIS.

- a) La identificación de virus rábico por inmunofluorescencia directa en improntas de glándula parótida es similar al método convencional a partir de tejido cerebral.



2. REVISIÓN DE LITERATURA.

2.1. Virus rábico.

La rabia se considera una de las enfermedades de mayor impacto para la salud pública y animal, el nombre de esta enfermedad proviene del Latín *Rabbas* que traducida al castellano significa “actuar con violencia”; además a la rabia, también se la conoce como hidrofobia, es la zoonosis viral de mayor importancia causada por un virus que afecta a animales domésticos y salvajes, y se propaga a las personas a través del contacto con la saliva infectada, mordeduras o arañazos (1).

La rabia es una enfermedad inscrita en la lista del Código Sanitario para los Animales Terrestres de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (2). La rabia está presente en todos los continentes, excepto en la Antártida, pero más del 95% de las muertes humanas por rabia se registran en Asia y África. Una vez que aparecen los signos y síntomas, la enfermedad el humano es casi siempre mortal (1).

En América Latina, la rabia es un importante problema de salud, sobre todo en animales silvestres. Frecuentemente el virus rábico se ha aislado de quirópteros hematófagos (3).

2.2. Sinonimia

La rabia también conocida como: Hidrofobia, Encefalitis rábica, Rabia paralitica en bovinos (5).

2.3. Distribución:

La rabia se presenta en todos los continentes con excepción de la mayor parte de Oceanía. En la actualidad, varios países están libres de la infección, entre ellos Uruguay, Barbados, Jamaica y varias otras islas del Caribe; Japón en Asia; varios países escandinavos, Irlanda, Gran Bretaña, Países Bajos, Bulgaria, España y Portugal en Europa. La rabia no tiene una distribución uniforme en los países Afectados, ya que en muchos de ellos existen áreas libres, de baja y de alta endemicidad, y otras con brotes epizootémicos (4).



2.4. Agente etiológico

El virus de la rabia pertenece al género *Lyssavirus*, familia *Rhabdoviridae*, tiene forma de bala, es de genoma ARN de sentido negativo con 5 proteínas estructurales: polimerasa viral (L), glucoproteína (G), nucleoproteína (N), proteína asociada a la nucleocapside(NS), y matriz proteica(M) (6)(7).

2.5. Taxonomía:

- Grupo: Virus con genoma de ARN en cadena sencilla sentido negativo.
- Orden: Mononegavirales.
- Familia: *Rhabdoviridae*.
- Género: *Lyssavirus*.
- Especie: *Rabies virus* (6)(7).

Tabla 1. Variantes virales del virus rábico

Genotipo	Serotipo	Cepa Prototipo (Abreviatura)	Distribución Geográfica	Hospederos*
1	1	Cepas de la calle o virus salvaje (RAB)	Cosmopolita; excepto en Australia, Inglaterra, Irlanda Nueva Zelanda, Japón, Antártida, Escandinavia, Hawai.	Humanos, murciélagos, bovinos
2	2	Lagos bat (LB)	Nigeria, Senegal, Zimbabwe, Rep. Centroafricana, Sudáfrica.	Murciélagos frugívoros, gatos, pero no humanos
3	3	Mokola (MOK)	Nigeria, Camerún, Zimbabwe, República Centroafricana.	Humanos, gatos, perros, musaraña, roedores
	Relación antigénica con Mokola	Obodhiang (OBD)	Sudán	Equinos, bovinos y mosquitos de la especie <i>Mansonia uniformis</i> .
	Relación antigénica con Mokola	Kotonkan (KOT)	Nigeria	Aislado de mosquitos del género <i>Culicoides</i> spp.
4	4	Duvenhage (DUV)	Sudáfrica, Zimbabwe.	Humanos, murciélagos insectívoros.
5		EBL subtipo 1 (EBL-1)	Francia, Polonia, Dinamarca, Alemania.	Humanos y murciélagos insectívoros: <i>Eptesicus</i> y <i>Pipistrellus</i> .
6		EBL subtipo 2 (EBL-2)	Francia, España, Dinamarca, Alemania.	Humanos y murciélagos insectívoros <i>Myotis</i> sp.
7		PLVs	Australia	Murciélagos frugívoros <i>Pteropus</i> spp. (zorras voladoras) y murciélagos <i>Saccolaimus flaviventris</i> .

Fuente. (6)

2.6. Morfología:

Las dimensiones del virión son 180 nm de longitud por 75 nm de diámetro, con forma típica de bala. El virus está envuelto por una bicapa lipídica (envoltura). En la membrana está insertada la glicoproteína denominada G que es la principal responsable de la patogenicidad viral, así como también el antígeno responsable de la inducción de anticuerpos neutralizantes (Figura 1).

Este virus es sensible en el medio exterior, a la luz, la desecación, pH extremos, el calor; es inactivado por sustancias como antisépticos (jabón y detergentes), glicerina, formol, hipoclorito de sodio o potasio, ácido fenico (6)(7).

2.7. Transmisión

La transmisión se produce casi exclusivamente por la mordedura de un animal rabioso, con la probabilidad de inocular el virus rábico contenido en la saliva del animal infectado; es menos frecuente a través de arañazo, lamedura de mucosa o de piel lesionada; excepcionalmente penetra por vía respiratoria al inhalarse en ambientes cargados con altas concentraciones de virus rábico, el cual se puede encontrar suspendidos en el aire (efecto aerosol), debido a falla de bioseguridad en centros de zoonosis, consultorios y clínicas veterinarias, bioterios, laboratorios de diagnóstico o de producción de vacunas para rabia (9).

Figura 1. Ciclo de transmisión de la Rabia Canina

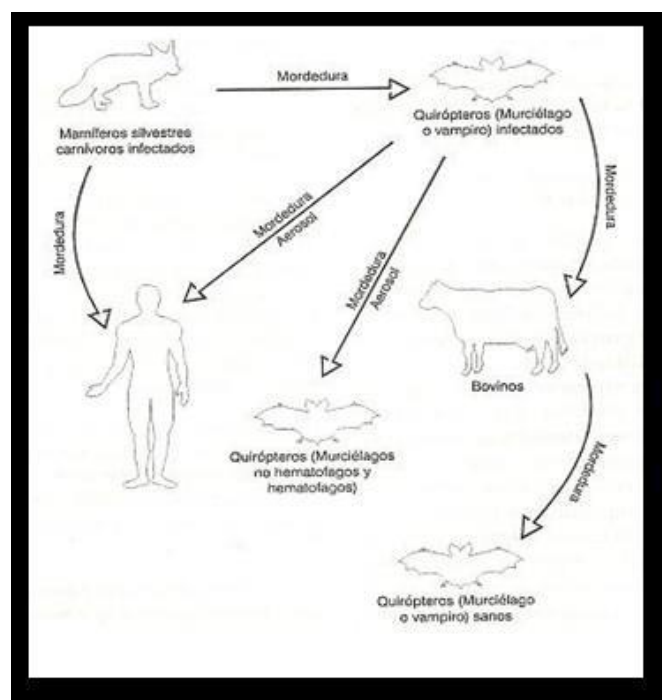


Fuente: (9)

2.8. Epidemiología:

La eficiencia de transmisión varía con la especie hospedadora y la presentación de la rabia. Los animales con la presentación furiosa de la rabia son más propensos a difundir la rabia que los animales con la forma paralítica. Antes de que aparezcan los primeros signos clínicos el virus se puede transmitir (periodo de transmisibilidad). Los gatos excretan el virus durante 1 a 5 días antes de que los signos aparezcan; el ganado en 1 a 2 días, en los zorrillos en un máximo de 14 días y murciélagos durante 2 semanas. La propagación del virus en los perros se suele decir que se limita de 1 a 5 días antes de la aparición de signos clínicos (5)(6)(7).

Figura 2. ciclo epidemiológico de la Rabia



Fuente: (5)

2.9. Patogenia de la rabia.

La patogenia de la rabia consiste en 4 fases:

- **La primera fase consiste** en la penetración del virus rábico al cuerpo de un animal susceptible por la mordedura de un animal rabioso.
- **La segunda fase** el virus progresa hasta el sistema nervioso central invadiéndolo.



- **La tercera fase** en el desarrollo de la enfermedad es la generalización de la infección y la diseminación del virus rábico desde el sistema nervioso central (SNC) a otros órganos especialmente a las glándulas salivales ya que la forma más común de transición de la rabia es la mordedura.
- **La cuarta fase** ocurre la sinología rábica y la muerte del animal (11) (12).

2.9.1. Patogénesis del Sistema Nervioso Central

La primera evidencia de replicación viral ocurre en los ganglios espinales situados en las raíces dorsales o posteriores de los nervios espinales y donde se alojan los cuerpos de las neuronas; que proporcionan inervación al sitio inoculado.

De este punto, se diseminan por las astas dorsales y neuronas de las raíces de los nervios dorsales y rara vez se le encuentra en las astas ventrales. Ocasionalmente algunos axones de la sustancia blanca espinal mostraban fluorescencia. Después de un periodo de latencia de duración variable, según la cepa de virus y otros factores, el antígeno viral reaparece, como se ha indicado, en los ganglios espinales de donde procede la inervación al sitio de la inoculación. A partir de este momento, los eventos se aceleran, de forma que algunas horas después (48 en caso de CVS) el virus ha invadido el SNC y la muerte del animal ocurre cierto tiempo después. La invasión generalizada del SNC ocurre en el caso de CVS, entre 96 y 110 horas después de la inoculación y la muerte puede sobrevenir entre las 130 y 168 horas después de la inoculación (11).

2.10. Diseminación del Virus rábico desde el SNC a otros órganos

Si el virus rábico sólo infectara el SNC y no a otros órganos, sería una infección terminal, es decir, carecería de los medios necesarios para su diseminación. La diseminación del virus rábico a los diferentes órganos del cuerpo es un proceso al que se ha denominado generalización (10). La diseminación centrífuga ocurre simultáneamente con el proceso de infección ascendente del SNC. Se ha mencionado que el primer sitio de multiplicación del virus en el SNC son los ganglios espinales ipsilaterales al sitio de la inoculación.

Poco tiempo después (uno o dos días) se encuentra la infección en cantidad decreciente en los ganglios espinales ascendentes tanto ipsilaterales como contralaterales al sitio de la



inoculación. Mientras la infección asciende hasta el tálamo encefálico, cerebelo y cerebro, también ocurre una diseminación centrífuga simultánea que oscurece considerablemente el cuadro de la diseminación del virus rábico (11).

En el caso del CVS el virus se encuentra en órganos extraneurales sólo unas pocas horas antes de la muerte (12), en tanto que animales infectados con virus de calle, no es raro encontrar virus en el nervio ciático opuesto al miembro inoculado 8 días post-inoculación y con animales aparentemente sanos (12). Los órganos extraneurales de mayor importancia en la transmisión de la rabia son las glándulas salivales, ya que la forma más común de la transmisión de la rabia es por medio de la mordedura.

El porcentaje de animales con virus rábico en las glándulas salivales es variable, según la cepa de virus (11).

El 74% de los perros, el 47% de los bovinos y el 88% de los gatos muertos de rabia han sido encontrados con virus rábico en sus glándulas salivales (11). Eventualmente puede considerarse que, si el animal vive lo suficiente, todos los órganos son potencialmente capaces de encontrarse infectados en un grado mayor o menor (10), sin embargo, existe la controversia de si la generalización del virus rábico ocurre por vía hemática, por medio de una viremia transitoria o bien por vía nerviosa (12).

2.11. Manifestaciones clínicas.

Las primeras manifestaciones son la fiebre, que a menudo se acompaña de dolor en el lugar de la herida. A medida que el virus se propaga por el sistema nervioso central se produce una inflamación progresiva del cerebro y la médula espinal que acaba produciendo la muerte (1).

Una observación que se ha hecho en repetidas ocasiones es que cuando se presentan los primeros signos de rabia, la enfermedad ya se ha difundido en todo el SNC y también se ha difundido por todo el organismo, se ha generalizado (12). El virus rábico se encuentra en la saliva de los perros rabiosos hasta seis días antes de la presentación de los primeros signos. Se ha mencionado previamente que el periodo de incubación de la rabia es muy variable y que hay casos en los que se extiende hasta seis meses o más (11).



La enfermedad puede adoptar dos formas. En la primera, la rabia furiosa, con signos de hiperactividad, excitación, hidrofobia y, a veces, aerofobia, la muerte se produce a los pocos días por paro cardiorrespiratorio.

La otra forma, la rabia paralítica, representa aproximadamente un 30% de los casos humanos y tiene un curso menos dramático y generalmente más prolongado que la forma furiosa. Los músculos se van paralizando gradualmente, empezando por los más cercanos a la mordedura o arañazo.

2.12. Periodo de incubación.

Depende de varios factores como cantidad de dosis de virus aplicada o inoculada, cepa del virus, la inmunidad del hospedero, la virulencia y del sitio de inoculación; cuanto más cerca este la cabeza, o áreas muy inervadas, más corto será el tiempo de incubación (10).

2.13. Diagnóstico

Para el diagnóstico de rabia se emplean dos pruebas de rutina: la prueba de inmunofluorescencia directa (IFD) y la prueba biológica de inoculación en ratones (IR). Ambas pruebas poseen una alta sensibilidad y especificidad analítica.

La prueba de inmunofluorescencia directa (IFD) es una prueba rápida, que permite obtener resultados en unas pocas horas. Por el contrario, la prueba de inoculación en ratones (IR) posee una mayor especificidad, pero los resultados se obtienen en 21 días, además que confirma el diagnóstico de pruebas negativas por IFD (13).

La identificación del agente se lleva a cabo preferentemente mediante la prueba de IFD a un frotis de tejido cerebral fijado con acetona, a ser posible preparado a partir de varias partes del sistema nervioso central. La IFD proporciona un diagnóstico confiable con un margen de seguridad del 98–100% (14).

2.13.1. Método biológico:

2.14.1.1 *Inoculación en ratones.*

Es una prueba confirmatoria de los resultados de la prueba de inmunofluorescencia directa (IFD) y en casos que la prueba de IFD son negativos.

La inoculación de ratones es el método más sensible para detectar al virus de la rabia. Todas las cepas de ratones parecen ser susceptibles a rabia. La inoculación intracerebral de ratones con Virus rábico produce infección típica. Los ratones inoculados usualmente enferman entre los 7 y 15 días, y una vez que muestran signos de enfermedad, y se manifiesta con erizamiento del pelo, parálisis corporal, postración y muerte. Se procede a realizar la prueba de IFD para determinar si la muestra inoculada es positiva a rabia (14) (15).

Figura 3. Inoculación Intracerebral en ratones CD-1.



Fuente: (16)

2.14.1.2. *Animales de laboratorio.*

Se utilizan ratones albinos suizos cepa CD-1, debida a su susceptibilidad, pureza y facilidad de manejarlos en el laboratorio. Los ratones son susceptibles a cualquier edad. Sin embargo, se recomienda emplear ratones de 21 días y de 11 a 14 g de peso, por su fácil manejo en el momento de la inoculación.

Los ratones de ambos sexos tienen la misma susceptibilidad, pero no es recomendable tenerlos en una misma jaula, debido al daño que se pueden infligir al estar juntos. Es indispensable que los animales vengan de un bioterio de producción con condiciones óptimas de crianza. Se desechará cualquier animal que tenga ectoparásitos, pelo erizado o signos de

diarrea. Si los ratones han sido enviados desde lejos, es conveniente esperar por lo menos 2 días antes de la inoculación (13).

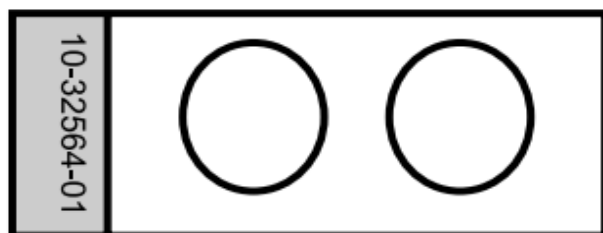
2.13.2. Método no biológico:

2.14.2.1. Técnica de IFD para la detección del antígeno rábico.

La técnica de IFD está basada en la reacción antígeno-anticuerpo que ocurre al enfrentar la impronta positiva (antígeno) con el conjugado antirrábico (anticuerpos). Esta reacción puede ser detectada mediante la luz ultravioleta del microscopio de fluorescencia (13).

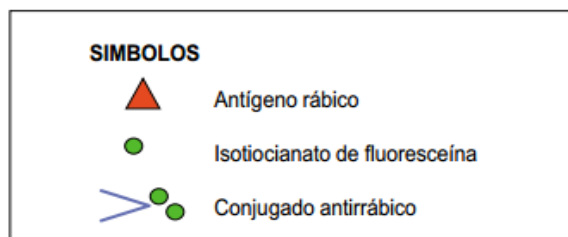
2.14.2.2. Esquema y simbología.

Figura 4. Esquema de lámina de IFD para rabia



Fuente (13)

Figura 5. Simbología empleada en la técnica de IFD



Fuente. (13)

2.14.2.3. Fundamento.

Si las improntas de cerebro y cerebelo contienen virus rábico, el resultado de la prueba será positivo. El antígeno está fijado y permeabilizado. Se añade una gota de conjugado antirrábico (conjugada monoclonal constituido por proteína de la nucleocapside mas fluoresceína) + CRN (cerebro normal de raton) a la impronta cercana al lado pavonado y otra gota de conjugado antirrábico + CVS (virus estándar de desafío) a la impronta alejada del lado pavonado. Luego, se incuba los porta-objetos a 37°C por 30 minutos. Si la impronta tiene antígeno rábico, se unirá el conjugado antirrábico + CRN a la impronta del lado izquierdo, formando el complejo antígeno-anticuerpo.

En la impronta que contiene el conjugado + CVS no se unirán los anticuerpos a la impronta porque ya están tomados por el CVS. Estos complejos conjugados + CVS serán retirados durante los lavados con el PBS (10).

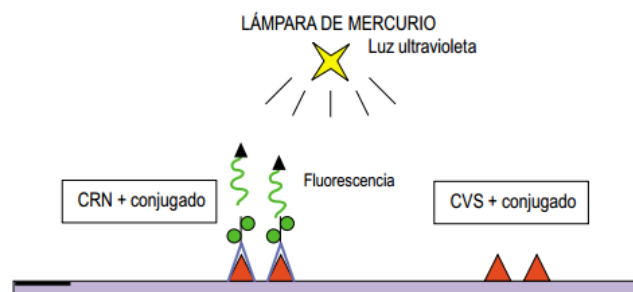
Figura 6. Fundamento



Fuente. (13).

La unión del conjugado antirrábico al antígeno rábico es detectada mediante la excitación de la luz ultravioleta que se observa por la fluorescencia de color verde limón emitida por el fluorocromo fitc (isotiocinato de fluoresceína) (13).

Figura 7. Unión del conjugado antirrábico al antígeno rábico.



Fuente: (13).



3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Materiales:

3.1.1. Materiales de laboratorio:

3.1.1.1. *Biológicos:*

- CRN o CNR (Cerebro Normal de Ratón).
- Glándula parótida.
- CVS (Virus estándar de desafío).
- Anticuerpo monoclonal (DFA reagent).
- Ratones CD-1.
- Vacuna antirrábica (inmunización profiláctica pre-exposición) CRL.

3.1.1.2. *Físicos:*

- Microscopio de epifluorescencia.
- Cabina de Bioseguridad clase 2 tipo A2.
- Guantes de nitrilo.
- Respirador N-95.
- Gafas protectoras.
- Pipetas automáticas.
- Puntas amarillas-azules.
- Mangas de bioseguridad.
- Zapatones.
- Porta-objetos pavonados en un extremo.
- Vaso de precipitado 50ml.
- Mortero y pilón (fríos).
- Vaso de coplin.
- Tubo de ensayo 12 x 75.
- Jeringa (tuberculina) de 1 ml (una jeringa por muestra).
- Aguja 29G x 1/2''.
- Algodón.
- Guardián (Recipiente para descartar agujas).



- Pinza y tijera.
- Jaulas de ratones de metal o polipropileno con sus respectivas rejillas.
- Equipo de necropsia.
- Esterilizador.
- Incubadora.
- Ultra congelador.
- Timer.
- Centrifuga.

3.1.1.3. Químicos:

- Solución salina tamponada, pH 7,2-7,4.
- Alcohol.
- Acetona Q.P.
- Mounting fluid.
- Agua destilada.
- Reactivo diluyente de la rabia con NaN_3 al 1%.
- Cloruro de Sodio (NaCl).
- Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4).
- Fosfato di potásico K_2HPO_4 .

3.1.2. Materiales de escritorio:

- Computadora.
- Impresora.
- Cámara de fotos y video.
- Memory Flash.



3.2. Métodos:

Esta investigación fue de carácter experimental controlada en laboratorio del Centro de Referencia Nacional en Zoonosis Regional Austro del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública – Leopoldo Izquieta Pérez (INSPI-LIP) en la provincia del Azuay del cantón Cuenca ubicado en la parroquia Cañaribamba.

3.2.1. Metodología para la investigación experimental:

3.2.1.1. *Factor de estudio:*

Fue en tejido parotídeo, cerebral de ratones CD-1 inoculados con diferentes dosis de CVS y se preparó 140 improntas para su examinación por IFD.

3.2.2. Métodos de laboratorio

3.2.2.1. *Análisis de las muestras:*

Las muestras fueron obtenidas, procesadas y analizadas en el Centro de Referencia Nacional en Zoonosis Regional Austro del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública – Leopoldo Izquieta Pérez (INSPI-LIP).

3.2.3. Obtención, procesamiento, y análisis de las improntas de tejido cerebral y tejido parotídeo en el laboratorio:

Protocolo analítico para el uso de tejido parotídeo en el diagnóstico de rabia.

3.2.3.1. *Inoculación intracerebral del ratón.*

1. Se trabajó con 4 grupos de 20 animales cada grupo, a los tres de cuales se les aplico diferentes dosis de virus estándar de desafío más el grupo control (suero equino).
2. Sujeción al ratón, con la mano libre sostener la jeringuilla con la dosis de inóculo correspondiente al grupo experimental, manteniendo el bisel hacia arriba.
3. Inocular en el punto medio de una línea imaginaria trazada mentalmente del ojo a la oreja.



4. Introducir la aguja dentro del cráneo en ángulo recto, e inocular la cantidad de inóculo según el grupo experimental, después de inoculado, observar que una gota del inóculo aparezca en el sitio de la inoculación.
5. Terminada la inoculación se procede a desechar la aguja en el guardián y el cuerpo de la jeringuilla en el recipiente correspondiente.
6. Mantener en observación a los ratones; aquellos que mueren dentro de las primeras 24 a 48 horas se consideran fuera de la investigación experimental, ya que éstos pudieron haber muerto por traumatismo.
7. Dejar que el proceso patológico del virus rábico concluya con la muerte de los animales, tomando en cuenta que cada grupo tiene lapso de tiempo de muerte experimental.

3.2.3.2. Extracción de la muestra de tejido parotídeo.

Recordando que las glándulas parótidas son las más grandes de las glándulas salivales. Tienen una localización subcutánea a cada lado de la cara y delante de las orejas rodeando los conductos auditivos externos.

1. Ubicar al animal en posición decúbito dorsal. Luego utilizando un bisturí realizar la incisión en piel, siguiendo la línea media desde la sínfisis mandibular hasta llegar al inicio de la cavidad torácica, luego retirar la piel hacia dorsal dejando expuesta la región del cuello, con lo cual observaremos claramente las glándulas parótidas de color nacarado o rosado brillante.

3.2.3.3.Preparación de las improntas de tejido parotídeo.

1. Los cortes de glándula parótida de 3 mm aproximadamente se colocan sobre una caja de Petri para posteriormente con una pinza situar una fracción de muestra sobre el bajalengua.
2. Con la mano derecha se toma un porta-objeto limpio y con la mano izquierda se toma el bajalengua, formando una cruz. Luego realice dos impresiones en cada lámina procurando que la impronta no sea muy gruesa. Si la impronta fuera muy gruesa, se podrá adelgazar presionando la impronta sobre el papel filtro.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

3. Colocar las láminas secas en un coplin con acetona fría (-20°C) por un mínimo de 30 minutos.
4. Una vez seca la impronta, se procederá a delinear los bordes de ambas improntas con un corrector líquido.

3.2.3.4. Aplicaciones de reactivo sobre las impresiones de tejido parotídeo.

1. Agregar 30 µl de Anticuerpo monoclonar (conjugado) + CRN a la impronta más cercana del extremo pavonado.
2. Agregar 30 µl de Anticuerpo monoclonar (conjugado) + CVS a la impronta más alejada del extremo pavonado.
3. Colocar las placas en la cámara húmeda y llevar a la estufa a 37°C por 30 minutos.
4. Colocar las placas en un Coplin y lavar dos veces con agua destilada más Solución salina tamponada (PBS) CONCENTRACION y dejar secar por 15 minutos.

3.2.5.5. Observar las improntas de tejido parotídeo en el microscopio de epifluorescencia.

1. Colocar en la impronta solución de montaje.
2. Observar la impronta con lente 100X. La observación de las láminas se iniciará en el extremo superior izquierdo y proseguirá hacia la derecha y luego hacia abajo, asegurando la observación ordenada de toda la impronta.

3.2.5.6. Interpretación de resultados de inmunofluorescencia para la detección de antígeno rábico.

1. Lámina control positivo: La impronta teñida con CRN + conjugado muestra un campo oscuro con células nerviosas, en cuyo interior o exterior, se observan estructuras redondeadas (corpúsculos rábicos) o pequeños puntos de color verde manzana. En el lado de la impronta teñida con CVS + conjugado, no deberá observarse fluorescencia de color verde limón.



2. Lámina control negativo: Ambas improntas no mostrarán ningún tipo de fluorescencia.
3. Láminas problema: Si la lámina se asemeja al control positivo, significará que la muestra es positiva; si se asemeja al control negativo, significa que la muestra es negativa, hasta que se emita el resultado de inoculación en ratones.

3.2.6. Método estadístico:

El diseño estadístico empleado fue analítico experimental.

Utilizando 100 animales con una mortalidad estimada del 10%. En la investigación se trabajó con 4 grupos de 20 animales cada uno (Grupo A: 100%, Grupo B: 40%, Grupo C: 70%, Grupo D: 140% más el grupo control inoculado con suero equino).

3.2.6.1. Tipos de pruebas estadísticas.

Para realización de la estadística, se realizó los siguientes análisis estadísticos:

1. Prueba de Chi cuadrado X^2 .
2. Prueba exacta de Fisher.
3. Regresión logística binaria.
 - a. X = variable independiente, es cuantitativa (%).
 - b. Y = variable dependiente, es cualitativa (presente, no presente), para determinar que dosis aproximada de virus estándar de desafío es posible, o más probable, determinar la presencia de rabia.
4. Gráficos y Figuras.

3.2.6.2. Especificación de las variables a evaluarse.

(X1) Tejido de referencia: Identificación del virus de la rabia en tejido parotídeo.

(X2) Cantidad de inóculo: Determinar la dosis ideal de virus estándar de desafío para el diagnóstico de rabia en glándula parótida.



3.2.6.3. Forma de registro.

Los datos se tomarán en hojas de registro de muestras para el diagnóstico de rabia (Anexo tablas) y en la ficha de registro de ratones inoculados (Anexo tablas). Que luego los datos obtenidos fueron tabulados y analizados respectivamente.



4. RESULTADOS.

De un total de 100 ratones utilizados en la presente investigación, 10 resultaron muertos por traumatismo durante la inoculación intracerebral con virus estándar de desafío (CVS) al 140%=0,04ml, 20 se usaron como grupo testigo (inoculación de suero equino) y los 70 restantes fueron analizados en la investigación.

Tabla N°2. Presencia de virus rábico tras inoculación intracerebral de virus estándar de desafío en base a los diferentes grupos de dosificación con virus estándar de desafío.

GRUPO				IMPRONTA	
				PAROTIDA	CEREBRO
GRUPO 1 (100%=0.03ml)	VIRUS RABICO	NO	CASOS	3	0
			%	15,0%	0,0%
		SI	CASOS	17	20
			%	85,0%	100,0%
	TOTAL		CASOS	20	20
GRUPO 2 (40%=0.01ml)	VIRUS RABICO	NO	CASOS	1	1
			%	5,0%	5,0%
		SI	CASOS	19	19
			%	95,0%	95,0%
	TOTAL		CASOS	20	20
GRUPO 3 (70%=0.02ml)	VIRUS RABICO	SI	CASOS	20	20
			%	100,0%	100,0%
	TOTAL		CASOS	20	20
GRUPO 4 (140%=0.04ml)	PRESENCIA DE VIRUS RABICO	NO	CASOS	0	1
			%	0,0%	10,0%
		SI	CASOS	10	9
			%	100%	90%
	TOTAL		CASOS	10	10

En la siguiente tabla se puede apreciar que no hay diferencia en la detección de virus rábico tanto en impronta de tejido parotídeo como en cerebro. Grupo uno (100%=0.03ml) 17 casos positivo en impronta de tejido parotídeo en cambio hay 20 casos positivos en cerebro.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Grupo 2 (40%=0.01ml) 19 casos positivos en impronta de tejido parotídeo y cerebro. Grupo 3 (100%=0.03ml) 20 casos positivos tanto en tejido parotídeo como en cerebro. Grupo 4 (140%=0.04ml) 10 casos positivo en impronta de tejido parotídeo y cerebro mientras que los otros 10 casos murieron por traumatismo.

Tabla N°3. Presencia de virus rábico tras inoculación intracerebral de virus estándar de desafío

			IMPRONTA		TOTAL
			PARÓTIDA	CEREBRO	
VIRUS RÁBICO	NO	CASOS	4	2	6
		%	5,7	2,9	
	SI	CASOS	66	68	134
		%	94,3	97,1	
TOTAL		CASOS	70	70	140
		%	100,0	100,0	
CHI CUADRADO		0.681	<i>P value</i> (Test Exacto de Fisher)= 0,681		

Del total de 70 individuos analizados, se obtuvo 70 improntas de tejido parotídeo y 70 de tejido cerebral; se detectó la presencia de virus rábico en 66 improntas de tejido parotídeo vs las 68 de tejido cerebral.

Resultados no significativos ($p > 0.05$) según Prueba de Chi – Square Test y Prueba exacta de Fisher por ende no hay diferencias estadísticas para la detección de virus rábico tanto en tejido parotídeo como cerebral. (Anexo 1).



Evaluación del impacto de las variables mediante un modelo de regresión logístico.

En la búsqueda de un modelo que permita sostener los resultados de manera conjunta, el análisis de regresión logística permite conseguir un resultado global. Para ello se aplicó el siguiente modelo:

$$\Pr(CVS = S) = \frac{1}{1 + e^{-(b_0 + b_1 * Im\ pronta + b_2 * Grupo)}}$$

En donde:

Impronta = variable cualitativa (Parótida y Cerebro).

Grupo = Con variable cuantitativa medida en %. (0.01, 0.02, 0.03 y 0.04)

Así los resultados del modelo fueron los siguientes (Anexo 8):

$$\Pr(CVS = S) = \frac{1}{1 + e^{-(4.03 - 0.72 * Im\ pronta - 20.99 * Grupo)}}$$

El modelo anterior expresa la relación entre la presencia o no de virus rábico de acuerdo a las variables del tipo de impronta y de la cantidad de inóculo (%/grupo). En una evaluación general, a pesar de que no existe evidencia estadística para expresar que las diferencias entre los valores observados y los valores esperados (Test Hosmer y Lemeshow, $p > 0.05$, Anexo 6), los valores del ajuste del modelo no son elevados (R^2 de Cox y Snell y Nagelkerke = 7% y 2,3% respectivamente, Anexo 7). Esto se corresponde con los resultados no significativos para cada variable del modelo estimado (Anexo 8), lo que indicaría como el modelo no fue significativo de manera global debido a que todos los resultados salieron $p > 0.05$.



Intervalo días.

El intervalo de días de detección del virus fue de 8 a 9 días.

	Sig
Chi – Square Test	0.261

La prueba de Chi – cuadrado demuestra que no hay diferencia significativa ($p>0,05$) entre el tiempo de detección de virus rábico ya sea en improntas de tejido cerebral o parotídeo.



5. DISCUSIÓN

En esta investigación se pudo corroborar que no hay diferencia significativa al momento de detectar rabia en muestras de tejido cerebral o parotídeo, lo cual se afirma en los resultados dados por F. Gury Dohmen & F. Beltrán; quienes hicieron un estudio con 26 improntas cerebrales positivas de murciélagos insectívoros, encontrando que el mismo número de muestras daba como positivo al realizar la detección con improntas de las glándulas salivales (parótida y submandibular) (17).

En el tejido parotídeo de los ratones inoculados experimentalmente con virus rábico durante la investigación, se detectó al virus en el 94,3% de las muestras tomadas en parótida, esto contrasta frente al estudio de M. Martell D. Y A. Aldasoro en agosto del 1972, quienes en su trabajo reportan un 67.3% de casos positivos en improntas de tejido parotídeo, en su estudio realizado a 80 perros infectados naturalmente; pudiendo así atribuir esta diferencia en porcentajes a la distinta afinidad que pueda presentar un virus fijo a un virus de calle por los tejidos extracelulares (18).

No se pudo realizar más discusiones debido a la poca información disponible sobre la investigación realizada.



6. CONCLUSIONES.

De la investigación realizada se obtuvieron las siguientes conclusiones:

El uso de tejido parotídeo y tejido cerebral no presentan una diferencia significativa en la detección del virus rábico.

La inoculación intracerebral con diferentes dosis de virus estándar de desafío en ratones CD-1; no muestra diferencia significativa en cuanto a la detección de virus rábico, por lo cual, basándose en los resultados obtenidos, se llegó a la conclusión que la dosis de 0.02ml (grupo número tres) es la que más presenta casos positivos para la detección del virus rábico en glándula parótida, mediante el uso de inmunofluorescencia directa, ya que utilizando dosis elevadas (0.04ml) se observó traumatismo y muerte instantánea.

La variación en el volumen de virus estándar de desafío no influye en el tiempo, así como la duración del período de supervivencia del animal infectado detección de virus rábico, esta investigación concluye que el número de días sugeridos para la detección de virus rábico en tejido parotídeo es de 8 a 9 días post inoculación intracerebral en ratones CD-1.



7. RECOMENDACIONES

Se recomienda el uso de tejido parotídeo para el diagnóstico de virus rábico como alternativa a la muestra de tejido cerebral, ya que presenta menor riesgo de contaminación.

Se recomienda el uso de tejido parotídeo no solo en ratones sino en otras especies sobre todo en bovinos, con el cual se podría corroborar la presente investigación. a fin de evitar la posibilidad de una infección en las personas que abren las cabezas de los animales.

Será de gran utilidad realizar el estudio en otro tipo de tejido no nervioso para poder comparar las ventajas y desventajas de los distintos tipos de muestra utilizados en el diagnóstico de la rabia en ratones.

Se recomienda utilizar el Protocolo analítico para el uso de tejido parotídeo en el diagnóstico de rabia elaborado en la presente investigación.



BIBLIOGRAFÍA

1. Rabia [Internet]. Organización Mundial de la Salud. 2017 [citado 27 septiembre 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/es/>
2. Código Sanitario para los Animales Terrestres [Internet]. 21st ed. París, Francia: Organización Mundial de Sanidad Animal; 2013 [citado 27 Septiembre 2017]. Disponible en : <https://www.oie.int/doc/ged/D12823.PDF>
3. López Santa Cruz Dámaza Irene, González Arrebato Jusayma, Morales Leslie Martha. Diagnóstico del virus rábico en quirópteros. Revista cubana Med Trop [Internet]. 2013 Abr [citado 2017 Septiembre 26]; 65(1): 119-124. Disponible en:http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602013000100013&lng=es.
4. Rabia [Internet]. Scribd. 2017 [citado 27 Septiembre 2017]. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/77801591/RABIA>
5. Delgado Cadena E, Guerrero Navarro I. Estudio epidemiológico retrospectivo de enfermedades zoonóticas de 2004 a 2008 en Colombia [Medico]. Universidad de la Salle, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Programa de Medicina Veterinaria; 2010.
6. Velasco Villa A. RABIA - Recursos en Virología - UNAM [Internet]. Facmed.unam.mx. 2017 [citado 27 Septiembre 2017]. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/virologia/rabia.html>
7. Costa Rica M. Rabia protocolo de vigilancia y control en humanos [Internet]. 1st ed. San José, Costa Rica; 2014 [citado 27 septiembre 2017]. Disponible en: <http://www.binasss.sa.cr/rabia.pdf>



8. Saad C, Martínez M. Protocolo de Vigilancia en Salud Pública de la Rabia en humanos, perros y gatos [Internet]. 2nd ed. Bogotá, Colombia; 2014 [citado 28 septiembre 2017]. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Protocolos%20SIVIGILA/PRO%20Rabia.pdf>
9. Bolivia E. La rabia, enfermedad mortal en el mundo [Internet]. Lapatriaenlinea.com. 2017 [citado 28 septiembre 2017]. Disponible en: <http://www.lapatriaenlinea.com/?nota=148912>
10. Correa Giron P. La Rabia, manifestaciones clínicas, transmisión, prevención y tratamiento [Internet]. 1st ed. Palo Alto, D.F. Mexico; 1981 [citado 1 octubre 2017]. Disponible en: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol3/CVv3c04.pdf>
11. Hernandez Baumgarten E. Patogenia de la rabia [Internet]. 2003 [citado 1 octubre 2017]. Disponible en: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol2/CVv2c3.pdf>
12. Baer G. The natural history of rabies. New York: Academic Press; 1975.
13. Lopez Ingunza R, Condori Condori R, Díaz Olivera A. Manual de procedimientos para el diagnóstico de la rabia [Internet]. Lima: Leonid Lecca García; 2012 [citado 27 septiembre 2017]. Disponible en: http://bvs.minsa.gob.pe/local/minsa/1047_INS-NT31.pdf
14. OIE. Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres (mamíferos, aves y abejas) [Internet]. 5th ed. París, Francia; 2004 [citado 2 octubre 2017]. Disponible en: <http://www.oie.int/doc/ged/d6508.pdf>
15. Manual de rabia - Vigilancia de Laboratorio - Diagnostico [Internet]. New.paho.org. 2007 [citado 2 octubre 2017]. Disponible en: <http://new.paho.org/arg/publicaciones/publicaciones%20virtuales/cdmanualRabia/vigilancialaboratoriodiagnostico.html>



16. About rabies:manual abdiag inoculation [SEARG] [Internet]. Searg.info. 2013 [citado 2 octubre 2017]. Disponible en:
<http://searg.info/doku.php?id=aboutrabies:manuallabdiaginoculation>.
17. Dohmen F, Beltrán F. Aislamiento de virus rábico en glándulas salivales de murciélagos insectívoros [Internet]. Buenos Aires, Argentina, 2008 [citado 4 octubre 2017]. Disponible en: <https://www.oie.int/doc/ged/D7102.PDF>
18. Detección del Virus Rábico [Internet]. Palo Alto, México DF; 1972 [citado 16 octubre 2017]. Disponible en:
<http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/10924/v73n2p117.pdf?sequence=1>



8. ANEXOS.

Anexo 1: pruebas de Chi cuadrado.

Anexo 1.1: Prueba Chi cuadrado para presencia del virus rábico en impronta.

Pruebas de Chi-cuadrado					
	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	0.697 ^a	1	0.404		
Corrección por continuidad ^b	0.174	1	0.676		
Razón de verosimilitudes	0.709	1	0.400		
Estadístico exacto de Fisher				0.681	0.340
Asociación lineal por lineal	0.692	1	0.406		
N de casos válidos	140				

Anexo 1.2. Prueba de Chi cuadrado y Prueba exacta de Fisher.

Grupo		Sig.	Significación exacta (2 caras)	Significación exacta (1 cara)
Grupo 1 (100%=0,03ml)	Chi cuadrado	0.072		
	prueba exacta de Fisher		0.231	0.115
Grupo 2 (40%=0.01ml)	Chi cuadrado	1.000		
	prueba exacta de Fisher		1.000	0.756
Grupo 3 (70%=0,02ml)	Chi cuadrado			
	n de casos válidos			
Grupo 4 (140%=0,04ml)	Chi cuadrado	0.305		
	prueba exacta de Fisher		1.000	0.500
Total	Chi cuadrado	0.404		
	prueba exacta de Fisher		0,681	0,340



Anexo 1.3: Prueba Chi cuadrado para grupo 1.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	3.243 ^a	1	0.072		
Corrección por continuidad ^b	1.441	1	0.230		
Razón de verosimilitudes	4.402	1	0.036		
Estadístico exacto de Fisher				0.231	0.115
Asociación lineal por lineal	3.162	1	0.075		
N de casos válidos	40				

Anexo 1.4: Prueba de Chi cuadrado para grupo 2.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	0.000 ^a	1	1.000		
Corrección por continuidad ^b	0.000	1	1.000		
Razón de verosimilitudes	0.000	1	1.000		
Estadístico exacto de Fisher				1.000	0.756
Asociación lineal por lineal	0.000	1	1.000		
N de casos válidos	40				



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Anexo 1.5: Prueba de Chi cuadrado para grupo 4.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	1.053 ^a	1	0.305		
Corrección por continuidad ^b	0.000	1	1.000		
Razón de verosimilitudes	1.439	1	0.230		
Estadístico exacto de Fisher				1.000	0.500
Asociación lineal por lineal	1.000	1	0.317		
N de casos válidos	20				

Anexo 2. Prueba de Hosmer y Lemeshow.

Paso	Chi cuadrado	gl	Sig.
1	7.355	6	0.289



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Anexo2.1. Tabla de contingencias para la prueba de Hosmer y Lemeshow.

		PRESENCIA_CVS = NO		PRESENCIA_CVS = SI		Total
		Observado	Esperado	Observado	Esperado	
Paso 1	1	0	0.784	10	9.216	10
	2	3	1.290	17	18.710	20
	3	0	1.059	20	18.941	20
	4	1	0.867	19	19.133	20
	5	1	0.396	9	9.604	10
	6	0	0.647	20	19.353	20
	7	0	0.528	20	19.472	20
	8	1	0.430	19	19.570	20

Resumen del modelo.

Paso	-2 log de la verosimilitud	R cuadrado de Cox y Snell	R cuadrado de Nagelkerke
1	48.558 ^a	0.007	0.023

Variables en la ecuación.

	B	E.T.	Wald	Gl	Sig.	Exp(B)
GRUPO	-20.993	40.389	0.270	1	0.603	0.000
Paso 1 ^a IMPRONTA	-0.724	0.884	0.672	1	0.412	0.485
Constante	4.028	1.238	10.585	1	0.001	56.173



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Anexo 3: toma de datos

Anexo 3.1: Registro de muestras para el diagnóstico de rabia

REGISTRO DE MUESTRAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE RABIA

Fecha	Nº muestra	Departamento	Provincias	Distrito	Localidad	Especie	IF	IR
	1							
	2							
	3							
	4							
	5							
	6							
	7							
	8							
	9							
	10							

IF = Resultado de inmunofluorescencia

IR = Resultado de inoculación en ratones

Anexo 3.2: Ficha o tabla de registro de ratones inoculados

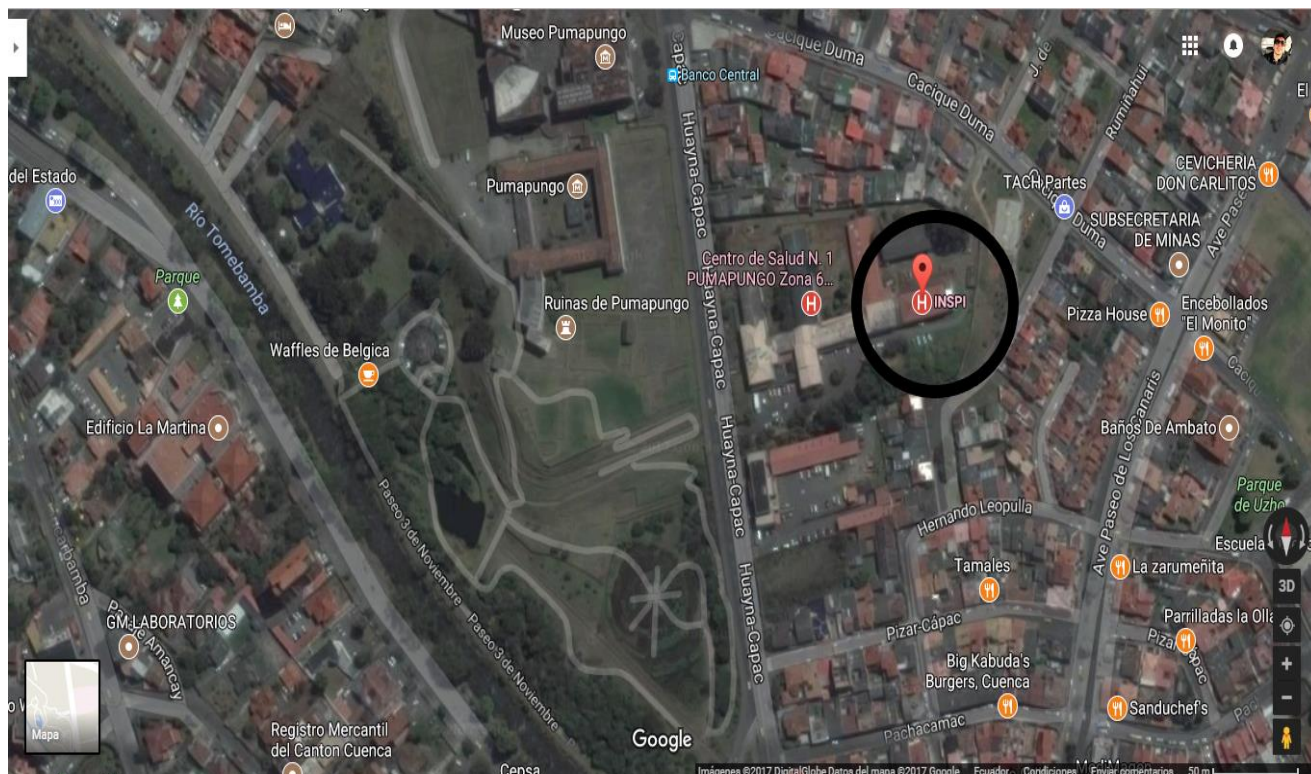
FICHA DE REGISTRO DE RATONES INOCULADOS

Fecha de inoculación	Responsable de la prueba	Inoculador
----------------------	--------------------------	------------

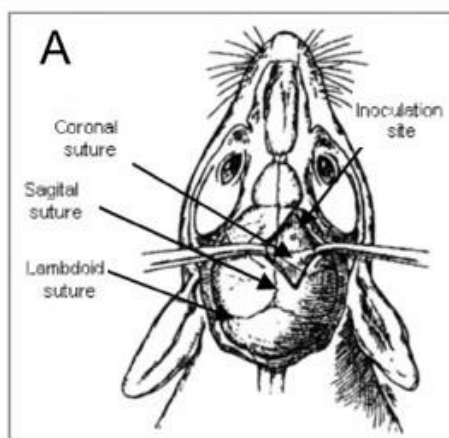
Nº muestra	Nº días después de inoculación																							IF
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21			
Nº muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		IF	
Nº muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		IF	
Nº muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		IF	

Código: E — erizado P — parálisis M — muerto I — normal C — comido
Pos — positivo a IFD N — negativo a IFD

Anexo 4. Mapa de ubicación.



Anexo 5. Inoculación intracerebral del ratón.



Anexo 5: Fotografías.

Foto N 1. Selección de ratones a inocular.



Foto N 2. Inoculación Intracebral.

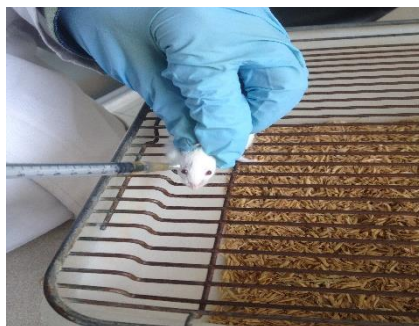


Foto N 3. Ratones en observación post inoculación.



Foto N 4. Ratones para extraer muestra.



Foto N 5. Toma de Muestra.



Foto N 6. Preparación de las improntas.



Foto N 7. Técnica de inmunofluorescencia directa.

